ResearchGate

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: https://www.researchgate.net/publication/215836872

Current status and future prospects of molecular biological techniques used in the species identification of agricultural pests

Conference Paper · January 2011

CITATIONS
0

READS
323

4 authors, including:

Shu-Chen Chang
Taiwan Agricultural Research Institute
38 PUBLICATIONS **193** CITATIONS
SEE PROFILE

Kuang-HUi Lu
National Chung Hsing University
42 PUBLICATIONS **336** CITATIONS
SEE PROFILE

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:

Project The development of immunoassay methods for pesticide residue analysis View project

All content following this page was uploaded by Shu-Chen Chang on 22 May 2014.

The user has requested enhancement of the downloaded file.

分子生物技術在農業害蟲鑑定之現況與展望

張淑貞[1]、姚美吉[1]、陳嬿后[2]、路光暉[2*]

摘要

傳統上，害蟲種類的鑑定主要是以成蟲之外部形態特徵為主要依據，對於卵、幼蟲及蛹等未成熟期，甚至殘骸的鑑定則較為困難，然而應用分生技術具解決此等鑑定問題之效。本文介紹幾種目前較常應用於農業害蟲種類鑑定的分生技術，包括 DNA 序列 (DNA sequence) 分析、逢機擴增多形性去氧核糖核酸-PCR (random amplification polymorphic DNA, RAPD-PCR)、序列特徵化增幅區域 (sequence characterized amplified region, SCAR)、PCR-限制酶多形性分析 (PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)、具種專一性之聚合酶鏈鎖反應 (species-specific PCR)、複合式聚合酶鏈鎖反應 (multiplex PCR) 及生物晶片 (biochip) 等，並進一步探討各分生技術在農業害蟲鑑定上之優缺點及其未來之應用展望。

關鍵詞：分生技術、種類鑑定、聚合酶鏈鎖反應、生物晶片

前言

害蟲是農業經營上的一大挑戰，針對不同種類的害蟲，需採取不同的防治對策，因此農業害蟲的種類鑑定實為害蟲防治之首要之務。傳統害蟲種類鑑定多以成蟲外部形態及生殖器 (genitalia) 等特徵為主要依據；對於卵、幼蟲及蛹等未成熟期的鑑定則較為困難。這對於大半生活史處於其未成熟期的多數害蟲而言，實為種類鑑定上的棘手問題；更遑論當害蟲僅餘殘

---

[1] 行政院農業委員會農業試驗所應用動物組　41301 台中市霧峰區萬豐里中正路 189 號

[2] 國立中興大學昆蟲學系　40227 台中市南區國光路 250 號

[*] 通訊作者，電子郵件: khlu@dragon.nchu.edu.tw

骸時，依據外部形態鑑定更是不易。再者，昆蟲種類繁多，同種個體間具多態型時有所聞，更增添以形態鑑定昆蟲種類的困難度。這樣的困境在分生技術日益進步、容易進行的有利條件下，已獲得相當的改善。

無論是有性生殖或無性生殖，源自受精卵或未受精卵，生物初始細胞核內的遺傳物質 DNA 皆會經過一連串的複製、分裂、分配至各子細胞，因此在個體所有細胞內的 DNA 皆完全相同，且不因其生長期不同而有所改變。同種內的所有個體共享一個基因池 (gene pool)，有其獨特的 DNA 組成，且明顯異於其他種生物。據此，藉由分生技術分析其 DNA 組成，將可大幅改善昆蟲種類鑑定的問題。在可資應用的各種分生技術當中，突破 DNA 量不足關鍵之聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 技術，更是一項重要的分水嶺。

聚合酶鏈鎖反應

聚合酶鏈鎖反應可在細胞外大量複製特定的 DNA 片段，以供進一步的研究與分析，大幅改善檢體 DNA 量不足的問題。其原理是仿照細胞內 DNA 複製合成的步驟，包括雙股 DNA 的變性分離 (90-95°C)、引子 (約 20-30 個核苷酸) 的黏合 (37-65°C) 及聚合酶進行的複製延伸 (72°C) 等三個步驟。PCR 技術發展之初，其所使用的聚合酶係萃取自大腸桿菌 *Escherichia coli*，最適反應溫度為 37°C，每次循環進行到雙股 DNA 的高溫變性分離時，此聚合酶就會被高溫破壞，因此每次循環都需重加一次聚合酶，使得整個操作流程非常繁瑣，且試管中逐次累積許多被破壞的酶，亦會增加反應的不穩定性。

1985 年 Karry Mullis 結合三個反應步驟至同一機器內進行，大幅提升 DNA 在細胞外複製的效率 (Saiki *et al.*, 1985; Mullis and Faloona, 1987)；而他也因在 PCR 技術方面的成就，獲得 1993 年的諾貝爾化學獎。後續，再加上自溫泉中耐高溫菌 *Thermus aquaticus* 中萃取出耐高溫的聚合酶 *Taq* DNA polymerase；此聚合酶能在高溫下進行反應，反覆經高溫 (90-95°C) 處理也不容易被破壞 (Saiki *et al.*, 1988)，使得 PCR 技術更加成熟可行，解決了生物遺傳物質研究中，DNA 量太少不易分析的瓶頸；基於此在體外大量複製 DNA 的技術，亦衍生出許多相關的分生技術，帶動下一波生物遺傳物質研究的熱潮。

分生技術應用於農業害蟲鑑定上之現況

DNA 是生物遺傳物質的本體，複製時會有一億分之一的錯誤機率，有些對生物基本生命功能並未產生嚴重影響的錯誤，可被留存並遺傳至下一代；而在天擇演化下，有利於生物生存的變異會被選擇留存下來，而有害者則會隨著生物的死亡而消失。這些逐代累積在生物體內的 DNA 序列差異，即為種內個體間與族群間差異的基礎；而這些差異在空間、時間、生態等多方面因素的加乘下，使不同族群間逐漸達到生殖隔離時，便形成了不同種。應用分生技術偵測個體間之序列變異，即可用來區分、鑑定不同分類群的昆蟲。茲將各種不同分生技術方法應用於農業害蟲鑑定敘述如下：

一、 DNA 序列之比對

應用 PCR 技術直接取得特定的 DNA 片段，經定序，再據此比對不同物種間的序列差異，可以直接區分害蟲種類。一般多採用較保守的基因，從事生物高階分類的分析；而類緣關係較近的分類群，則用變異性較高的 DNA 片段分析。Hebert 等人則大力倡議以粒線體之細胞色素 I (mitochondrial cytochrome oxidase I, COI) 基因序列為基礎，建立 DNA 條碼 (DNA barcode) 資料庫，作為全球生物鑑定系統 (global bioidentification system, GBS)，並以 COI 基因序列分析 200 種鱗翅目近源種昆蟲的差異，以佐證 COI 基因的適用性 (Hebert *et al.*, 2003)。Kohnen *et al.* (2009) 以粒線體 COI、COII、cytochrome b 基因序列，分析 *Rhagoletis alternata* (Fallen) 和 *Carpomya schineri* (Loew) 等 2 種果實蠅的差異；Scheffer *et al.* (2006) 以 COI 基因序列，區辨南美斑潛蠅 (*Liriomyza huidobrensis* (Blanchard))、非洲菊斑潛蠅 (*L. trifolii* (Burgess)) 及蔬菜斑潛蠅 (*L. sativae* Blanchard) 等入侵菲律賓的斑潛蠅；Elfékih and Haymer (2010) 以 COII 基因序列區分撒哈拉以南非洲地區 *Dacus* 及 *Ceratitis* 屬果實蠅。Shatters *et al.* (2009) 及 Qiu *et al.* (2009) 則分別都以 COI 基因序列分辨煙草粉蝨 (*Bemisia tabaci*) 的各生理小種 (biotype)；Li *et al.* (2011) 以核糖體 16S 基因 (16S ribosomal gene) 序列分析穀粉茶蛀蟲 (*Liposcelis bostrychophila*) 在歐洲、亞洲及美國各地區群的差異。Gullan *et al.* (2010) 以COI基因、核糖體 28S 基因及延長因子 (elongation factor 1-α, EF-1α) 基因序列，

分辨粉介殼蟲 *Ferrisia* 屬中的 *F. virgata* 及 *F. gilli*，並藉由序列資料，重新檢討其形態鑑定特徵的穩定性。Navajas *et al*. (1992) 以核糖體基因內轉錄間隔 2 (ribsomal DNA internal transcribed spacer 2, ITS2) 片段序列，鑑別 6 種常見葉蟎；Navajas *et al*. (1994) 則以 ITS2 片段及 COI 基因序列，分析非洲及南美洲同一種葉蟎 *Mononychellus progresivus* Doreste 的差異；Gotoh *et al*. (1998) 以 ITS2 片段，區別二點葉蟎 *Tetranychus urticae* 及 *T. puerariocola* 間的差異；Toda *et al*. (2000) 以 COI 基因序列，區辨 4 種 *Panonychus* 屬的葉蟎。

直接比對 DNA 序列的優點是序列證據最直接、準確，且可在網路上的 DNA 資料庫 (如 NCBI) 網站，直接搜尋比對；缺點則是需要尋找合適的引子，以增幅出預期的 DNA 片段，而且每一次的鑑定都要將此段 DNA 先進行 PCR 後，再回收 PCR 產物來進行定序。若此 DNA 片段序列內含有多段重複的序列，以 PCR 產物直接定序的結果就會很差，甚至無法正確判讀序列，此時就得先轉殖 PCR 產物，並經細菌培養、複製，再將載體由細菌中萃取出來，再進行將之定序，需耗費許多人力、物力及時間。

二、 逢機擴增多形性去氧核糖核酸-PCR (random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction, RAPD-PCR)

以 PCR 技術為基礎，Williams *et al.* (1990) 首先提出以 RAPD-PCR 方法比較人體、玉米、大豆及真菌間的歧異。即在缺少已知 DNA 序列可資合成引子的前提下，用一小段逢機合成的引子 (約 10 個核苷酸、50-80% GC)，進行基因體 DNA (genomic DNA) 的 PCR 反應；因其引子長度較短，且黏合溫度較低，引子黏附上整個基因體的位置較多樣，PCR 增幅後的 DNA 產物片段大小也很多樣，經電泳、染色後呈現其特有的電泳圖譜，可用來分析昆蟲及蟎類的種間差異，或甚至同種內不同族群間的差異。例如用在 6 種形態相似的斑潛蠅辨別 (Chiu *et al.*, 2000)；煙草粉蝨及銀葉粉蝨 (*B. argentifolii*) 的釐清 (De Barro and Driver, 1997; Guirao *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2004; Qiu *et al.*, 2009)；區分取食十字花科蔬菜葉部的楊瘿綿蚜 (*Pemphigus populitransversus*) 及取食根部的 *P. obesinymphae* (Chen *et al.*, 2009)；鑑定、分析美國中西部相近幾州，田間和倉庫中之印度穀蛾 (*Plodia interpunctella*) 族群 (Dowdy and McGaughey, 1996)；鑑定區分米象 (*Sitophilus oryzae* L.) 與玉米象 (*S. zeamais*

Motschulsky)(Hidayat *et al.*, 1996)；分析二點葉蟎不同族群間之差異，及其與赤葉蟎 (*T. cinnabarinus*)、神澤氏葉蟎 (*T. kanzawai*) 間之不同 (Hance *et al.*, 1998)。

RAPD-PCR 的優點是需要的檢體 DNA 較少，且在未知任何 DNA 序列之的情況下，即可直接用商品化的逢機引子進行 PCR 篩選，尋求具有種間差異代表的電泳圖譜。此方法的缺點是，為獲致最佳的引子黏合效果及最多樣的 PCR 增幅結果，RAPD-PCR 進行的時間是一般 PCR 的兩倍，且因引子黏合溫度較低，導致對序列的專一性低，產物不穩定、變異大，判讀不易；也因此不易篩選出可在不同個體、族群間穩定增幅的逢機引子。此外，由於其敏感的特性，即使相同的反應液，以相同的溫度、循環條件進行 PCR，亦可能因使用不同廠牌的聚合酶或 PCR 迴溫循環器，而產生不同的電泳圖譜，或者只保有較明顯的產物，而新增或減少其他不同大小的產物，增加判讀上的困擾。

三、 序列特徵化增幅區域 (sequence characterized amplified regions, SCARs)

SCAR 可解決 RAPD-PCR 結果不穩定的缺點；其方法係將 RAPD-PCR 的產物，選取具獨特性且穩定出現的 DNA 片段，將之分離、選殖與定序，再根據此 DNA 序列設計序列較長之專一性引子 (約 20-30 個核苷酸)，並確認其專一性及穩定性。此方法已被應用在鑑定重要檢疫害蟲蘋果蠹蛾 (*Cydia pomonella* L.)的幼蟲 (Lu *et al.*, 2003) 與光肩星天牛 (*Anoplophora glabripennis* Motschulsky)(Kethidi *et al.*, 2003)；鑑別東方果實蠅 (*Bactrocera dorsalis* Hendel)、瓜實蠅 (*Ba. cucubitae* Coquillet) 及南瓜實蠅 (*Ba. tau* Walker) 等 3 種臺灣主要瓜果實蠅 (圖一)(Lu *et al.*, 2002)；其他應用實例如 Behura *et al.* (1999) 將其應用在亞洲水稻癭蚊 (*Orseolia oryzae* Wood-Mason) 生物小種的鑑定；Lu *et al.* (2008) 應用在 6 種蚜蟲的鑑定等。

SCAR 所設計之專一性引子通常為 18-25 bp，較逢機引子的 10 bp 長，所以可提高 PCR 時的引子黏合溫度，藉此可提升 PCR 的專一性，減少非專一性片段被增幅，PCR 產物穩定度大為提升，也較容易判讀。因設計 SCAR 專一性引子的根據序列片段，是由逢機引子增幅基因體 DNA 而來，片段來源較多樣，生物各種間的序列差異較大，專一性引子的設計較容

易；但此專一性引子之獲得，需先選殖 RAPD-PCR 後的產物，並經細菌培養、複製，再將載體由細菌中萃取出來，並經限制酶確定產物確實有成功轉殖後，才能進行定序，最後才能據此定序結果設計專一性引子，相對也耗費更多發展時程、經費及人力。

四、 PCR-限制酶多形性 (PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 分析

PCR-RFLP 是先以 PCR 增幅特定基因片段，再以限制酶剪切此 DNA 片段後所建立的電泳圖譜分析法。其原理是因每一種限制酶只固定在一段 DNA 的特定序列處 (通常是 4-6 個 base) 剪切；因不同物種 DNA 序列不同，即可能具有不同的限制酶切位，或可能用同一限制酶剪切，但因剪切位置不同，切下的 DNA 片段大小即不同。限制酶切割後的產物再經電泳、染色後會呈現一特有之電泳圖譜，藉由比較彼此間的差異性，即可用以探討不同種昆蟲間的親緣關係或種類鑑別。如以 COI 基因之限制酶圖譜鑑別檢疫害蟲萵苣蚜 (*Nasonovia ribisnigri* Mosley) 及本地種桃蚜 (*Myzus persicae*)、豌豆蚜 (*Acyrthosiphon pisum*)(Yeh *et al.*, 2006)；以 ITS1 片段之限制酶圖譜鑑定 3 種白輪盾蚧：蘇鐵白輪盾蚧 (*Aulacaspis yasumatsui* Takagi)、樟白輪盾蚧 (*A. yabunikkei* Kuwana) 和月橘白輪盾蚧 (*A. murrayae* Takahashi)(Chiu *et al.*, 2001)；以 COII 基因之限制酶圖鑑別危害園藝作物之 16 種 *Otiorhynchus* 屬的象鼻蟲 (Hirsch *et al.*, 2010)；以 ITS1 片段之限制酶圖譜鑑定檢疫害蟎之刺足根蟎 (*Rhizoglyphus echinopus* Fumouze & Robin) 及臺灣本地既有害蟎羅賓根蟎 (*R. robini* Claparede) 與長毛根蟎 (*R. setosus* Manson) (圖二)(Liu *et al.*, 2006)；以 ITS2 片段之限制酶圖譜鑑定二點葉蟎及 *T. pueraricola* (Gotoh *et al.*, 1998)；以 ITS 片段之限制酶圖譜區辨常見之 *Tetranychus* 屬的葉蟎等 (Osakabe *et al.*, 2002; Hurtado *et al.*, 2008; Osakabe *et al.*, 2008)。

PCR-RFLP 分析方法的優點是較 PCR 可更確定物種種類。缺點是要先尋找可順利增幅出所欲分析 DNA 片段的 PCR 引子，繼之根據此等序列，篩選具有辨別性的限制酶；然而實際應用時，在進行 PCR 後，還要將此 PCR 產物回收，再以限制酶剪切，最後再以電泳分析，耗費時間較長、步驟較繁瑣。但總括來說，耗費時間仍較定序所需時間短。

五、 具種專一性之聚合酶鏈鎖反應 (species-specific PCR)

以 PCR 增幅特定片段的 DNA 及定序後，針對不同物種在此段 DNA 的序列差異處，設計具種專一性引子，可在一次 PCR 中就區分出不同的物種。如在檢疫害蟲鑑定方面，以 COI 基因序列，設計專一性引子鑑別 6 種象鼻蟲，包括李象鼻蟲 (*Conotrachelus nenuphar*)、白喙粗吻象鼻蟲 (*Graphognathus leucoloma*)、新幾內亞甘蔗象鼻蟲 (*Rhabdoscelus obscuru*) 等 3 種為檢疫外來種，以及甘薯蟻象 (*Cylas formicarius*)、粉綠象鼻蟲 (*Hypomeces squamosus*)、臺灣三月始灰象鼻蟲 (*Sympiezomias cribricollis*) 等臺灣本地種 (Lin *et al.*, 2008)。亦有以 ITS1 片段序列設計專一性引子，鑑定重要檢疫害之蟎刺足根蟎及臺灣本地既有害蟎羅賓根蟎、長毛根蟎 (Liu *et al.*, 2006)。

此方法之優點是專一性引子建立後，一次 PCR 就可以確定此 DNA 來源是否為預期的種類，較為快速、經濟。缺點是要尋找合適的引子增幅出特定的 DNA 片段已不容易，經定序後再去比對相近物種序列之差異處，據此找出專一性引子可穩定、專一性的區辨不同種類更不容易，而且相近種類越多，專一性引子的設計也會越困難；另因一次 PCR 僅能鑑定一個種類，若此 DNA 來源預期是 3 個相近種之一，則需分別進行 3 個專一性 PCR，操作較繁雜。

六、 複合式聚合酶鏈鎖反應 (multiplex PCR)

此方法即是於一個 PCR 反應中同時置入多組專一性引子，可同時偵測兩種以上的 DNA 來源種類。如以 3 種根蟎之 ITS1 片段序列，設計 3 組專一引子，可分別放大 3 種根蟎，將此 3 組引子混和後進行一次 PCR，即可同時鑑定這 3 種根蟎，節省 3 倍的時間及耗材 (圖三)(Liu *et al.*, 2006)。其他應用實例如重要檢疫害蟲西方花薊馬 (*Frankliniella occidentalis* Pergande)(Liu, 2004) 與節蜱類害蟎 *Cecidophyopsis* mites 的鑑定 (Kumar *et al.*, 1999)。

此複合式聚合酶鏈鎖反應方法之優點是只要進行一次 PCR，就可同時鑑定出 2 種以上的昆蟲或蟎類，實際使用上較為快速、有效率且更為節省經費。缺點是尋找專一性引子已如前述不容易，要將所有引子混和在同一 PCR 溶液中，不會互相干擾，仍能各自增幅出專一性片段，且其片段大小又各可於電泳圖上清楚區別，此兼具符合序列差異及預期長度的專一

性引子，尋找時的困難程度更大。受限於該段 DNA 的特性及長度，及相近種類數目的多寡，複合式聚合酶鏈鎖反應鑑定技術的建立，總括來說更不容易。

七、 南方墨點雜合技術 (Southern hybridization)

運用南方墨點雜合技術，可將體 DNA 或 PCR 增幅特定片段 DNA，經特定限制酶剪切後，電泳、轉漬到濾片上，如硝化纖維濾片 (nitrocellulose filter)，再與經過同位素標定的特定基因片段雜合。基於 DNA 兩互補股間會相互配對黏合的原理，標的 DNA 與同位素標定的基因片段，彼此序列互補處即可互相黏附上，藉此將同位素固定在濾片上。藉由自動輻射照相術 (autoradiography)，即將此濾片與 X 光底片放置在一起，同位素即會在底片上產生一類似曝光的黑條帶，藉此表現出限制酶剪切後的片段多形性 (RFLP)。再據此多形性片段圖譜探討不同種群間的地理性差異或基因交流等狀況。Colgen (1991) 分別以粒線體 DNA 7.2 kb 及核糖體 DNA 3.9 kb 為探針，探討澳洲直翅目蝗科 (Acrididae)中，Oxyinae 及 Catantopinae 2 個亞科間的關係。Xu *et al*. (2002) 以 DOPA decarboxylase (DDC) 基因中的 730 bp 為探針，探討分布在中國大陸黃河流域及長江流域之棉花主要害蟲棉鈴蟲 (*Helicoverpa armigera* (Hübner)) 族群間的異同。

南方墨點雜合技術因使用放射性同位素標定，即便後來發明以其他不具放射性的化學物質，如生物素 (biotin) 等，取代同位素標定，但因步驟繁瑣，較不適合用來做害蟲的常規鑑定，多運用在昆蟲種群間基因流動的分析。與此技術基於相同原理，但相關技術、流程不同的則為生物晶片技術。

八、 生物晶片 (biochip)

生物晶片是近年來新發展的害蟲鑑定方法。此法依偵測對象不同，分成許多類別，其中較適於進行昆蟲種類鑑定的為寡核苷酸晶片 (oligonucleotide chip)。其原理是藉由 DNA 兩互補股間可黏合的特性，且其黏合具序列專一性，藉此判別種類的異同。此原理與南方墨點雜合技術的基本原理相同。發展流程則是先將標的 DNA (target DNA)，如 COI 基因，以 PCR 增幅、定序後，根據不同種間的序列差異處設計單股 DNA 的探針 (probe)，再將此探針點佈、固定在晶片上，此與南方墨點雜合法將體 DNA 固定在晶片上剛好相反。生物晶片在使用時

先以螢光或其他呈色反應物標定過的引子，進行特定 DNA 片段的增幅，一方面可增加偵測的敏感度，一方面也可藉此將標的 DNA 標上螢光或其他呈色反應物，使其在與探針黏合後，在後續的呈色反應中呈色，並藉此判斷種類。臺灣目前僅有檢疫害蟲蘋果蠹蛾 (*Cydia pomonella*)、桃蛀果蛾 (*Carposina sasakii*)、梨小食心蟲 (*Grapholita monesta*)、栗小卷蛾 (*Cydia splendana*) 及淡棕色蘋果蠹蛾 (*Epiphyas postivittana*) 的生物晶片，以及可鑑定 11 種不同果實蠅類害蟲的生物晶片，已初步完成 (路等，未發表資料)。後續則尚有葉蟎、根蟎、薊馬及木蝨的生物晶片在陸續研發中。

生物晶片的優點是一片晶片可點佈上千個探針，且探針間彼此互不接觸，不會有互相干擾的狀況，理論上可同時篩檢上千種昆蟲或蟎類，亦即可直接在一次 PCR、雜合、呈色後，判定多種害蟲的種類，大大降低操作的時間；在樣本種類與數量很多時，相對上述其他方法會更為快速。其缺點則是在有限長度的 DNA 片段中，要尋找足夠差異的序列設計探針，並不容易，且此探針還要能穩定且具專一性的與特定種類黏合，更需經過多次的測試。再者，發展晶片的過程需具備探針設計技術、將探針點佈在晶片上的設備及技術、雜合設備及呈色技術等，技術及設備門檻較高，所以生物晶片應用在昆蟲種類鑑定上的實例目前還不多見，但隨著生物晶片的基本技術、設備發展越趨成熟、簡便，將來想必會有更多的應用實例，前景可期。

結論

農業害蟲種類鑑定堪稱為害蟲防治之首要之務，確定防治對象之後，才能尋求相應防治對策。傳統形態鑑定在害蟲種類鑑定上不足之處，恰可由分生技術鑑定補足。前述各種不同方法，除南方墨點雜合外，均已被應用於害蟲種類鑑定上。整個開發與應用過程，可在外部形態特徵明顯的成蟲時期，取得標本，先建立害蟲形態鑑定特徵以確定其種類，再據以建立之分生鑑定特徵，如此則可廣泛應用在昆蟲未成熟期及殘骸的鑑定，有效解決防疫及檢疫最棘手的種類鑑定問題。隨著分生技術的持續進步，更快速、簡便、經濟的農業害蟲鑑定技術也將更令人期待。

引用文獻

Behura, S., S. Sahu, S. Rajamani, A. Devi, R. Mago, S. Nair, and M. Mohan. 1999. Differentiation of Asian rice gall midge, *Orseolia oryzae* (Wood Mason), biotypes by sequence characterized amplified regions (SCARs). Insect Mol. Biol. 8: 391-397.

Chen, N., T. X. Liu, M. Setamou, J. V. French, and E. S. Louzada. 2009. Molecular identification and population dynamics of two species of *Pemphigus* (Homoptera: Pemphidae) on cabbage. Insect Sci. 16: 115-124.

Chiu, Y. C., W. J. Wu, and C. J. Shih. 2001. Identification of three *Aulacaspis* species (Homoptera: Diaspididae) by PCR-RFLP analysis for quarantine application. Formosan Entomol. 21: 365-375 (in Chinese).

Chiu, Y. C., W. J. Wu, S. F. Shiao, and C. J. Shih. 2000. The application of RAPD-PCR to develop rapid diagonstic technique for identification of 6 species of *Liriomyza* spp. (Diptera: Agromyzidae). Chinese J. Entomol. 20: 293-309 (in Chinese).

Colgan, D. J. 1991. Phylogenetic studies of acridoid grasshoppers comparing 2n2- and 4-base recognizing endonucleases. J. Evol. Biol. 4: 575-591.

De Barro, P. J., and F. Driver. 1997. Use of RAPD PCR to distinguish the B biotype from other biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). Aust. J. Entomol. 36: 149-152.

Dowdy, A. K., and W. McGaughey. 1996. Using random amplified polymorphic DNA to differentiate strains of the Indianmeal moth (Lepidoptera: Pyralidae). Environ. Entomol. 25: 396-400.

Elfékih, S., and D. S. Haymer. 2010. Molecular taxonomic identification of *Dacus* and *Ceratitis* species from sub-saharan Africa using mitochondrial haplotypes. J. Econ. Entomol. 103:

1842-1847.

Gotoh, T., J. Gutierres, and M. Navajas. 1998. Molecular comparison of the sibling species *Tetranychus pueraricola* Ehara et Gotoh and *T. urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). Entomol. Sci. 1: 55-57.

Guirao, P., F. Beitia, and J. Cenis. 1997. Biotype determination of Spanish populations of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). Bull. Entomol. Res. 87: 587-594.

Gullan, P. J., M. B. Kaydan, and N. B. Hardy. 2010. Molecular phylogeny and species recognition in the mealybug genus *Ferrisia* Fullaway (Hemiptera: Pseudococcidae). Syst. Entomol. 35: 329-339.

Hance, T., P. Neuberg, and C. Noèl-Lastelle. 1998. The use of fecundity, lobe biometry and the RAPD-PCR technique in order to compare strains of *Tetranychus* sp. Exp. Appl. Acarol. 22: 649-666.

Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball, and J. R. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proc. R. Soc. Lond B 270: 313-321.

Hidayat, P., T. W. Phillips, and R. H. Ffrench-Constant. 1996. Molecular and morphological characters discriminate *Sitophilus oryzae* and *S. zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and confirm reproductive isolation. Ann. Entomol. Soc. Am. 89: 645-652.

Hirsch, J., P. Sprick, and A. Reineke. 2010. Molecular identification of larval stages of *Otiorhynchus* (Coleoptera: Curculionidae) species based on polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. J. Econ. Entomol. 103: 898-907.

Hurtado, M. A., T. Ansaloni, S. Cros-Arteil, J. A. Jacas, and M. Navajas. 2008. Sequence analysis of the ribosomal internal transcribed spacers region in spider mites (Prostigmata: Tetranychidae) occurring in citrus orchards in Eastern Spain: use for species discrimination. Ann. Appl. Biol.

153: 167-174.

Kethidi, D. R., D. B. Roden, T. R. Ladd, P. J. Krell, A. Retnakaran, and Q. Feng. 2003. Development of scar markers for the DNA based detection of the Asian long horned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Motschulsky). Arch. Insect Biochem. Physiol. 52: 193-204.

Kohnen, A., V. Wissemann, and R. Brandl. 2009. No genetic differentiation in the rose-infesting fruit flies *Rhagoletis alternata* and *Carpomya schineri* (Diptera: Tephritidae) across central Europe. Eur. J. Entomol. 106: 315-321.

Kumar, L. P., B. Fenton, and A. Jones. 1999. Identification of *Cecidophyopsis* mites (Acari: Eriophyidae) based on variable simple sequence repeats of ribosomal DNA internal transcribed spacer 1 sequences via multiplex PCR. Insect. Mol. Biol. 8: 347-357.

Li, Z. H., Z. Kučerová, S. Zhao, V. Stejskal, G. Opit, and M. Qin. 2011. Morphological and molecular identification of three geographical populations of the storage pest *Liposcelis bostrychophila* (Psocoptera). J. Stored Prod. Res. 47: 168-172.

Lin, G. W., S. L. Lu, T. Y. Huang, C. L. Shih, W. J. Wu, and C. C. Chang. 2008. Molecular identification of weevils significant for customs inspection and quarantine importance. Formosan Entomol. 28: 43-55 (in Chinese).

Liu, Y. C. 2004. Molecular identification of a plant quarantine pest (*Frankliniella occidentalis*) by one-tube nested PCR targeting ribosomal DNA internal transcribed spacer regions. Plant Prot. Bull. 46: 27-46 (in Chinese).

Liu, Y. C., S. C. Chang, W. H. Chen, and W. B. Shu. 2006. The application of single-step nested multiplex polymerase chain reaction for the identification of *Rhizoglyphus echinopus*, *R. robini* and *R. setosus* simultaneously. Plant Prot. Bull. 48: 101-116 (in Chinese).

Lu, K. H., C. M. Chang, C. Y. Chen, and Y. J. Chen. 2002. Development of species-specific PCR primers for identification of three key tephritid pests in Taiwan. Plant Prot. Bull. 44: 255-265 (in Chinese).

Lu, K. H., S. C. Chang, J. Y. Hsu, and J. T. Yang. 2003. A combination of traditional and modern techniques for insect identification- using the codling moth, *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae), as an example. Plant Prot. Bull. 45: 359-364 (in Chinese).

Lu, W. N., Y. T. Wu, and M. H. Kuo. 2008. Development of species-specific primers for the identification of aphids in Taiwan. Appl. Entomol. Zool. 43: 91-96.

Mullis, K. B., and F. A. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Method Enzymol. 155: 335-350.

Navajas, M., D. Cotton, S. Kreiter, and J. Gutierrez. 1992. Molecular approach in spider mites (Acari: Tetranychidae): preliminary data on ribosomal DNA sequences. Exp. Appl. Acarol. 15: 211-218.

Navajas, M., J. Gutierrez, O. Bonato, H. R. Bolland, and S. Mapangou-Divassa. 1994. Intraspecific diversity of the cassava green mite *Mononychellus progresivus* (Acari: Tetranychidae) using comparisons of mitochondrial and nuclear ribosomal DNA sequences and cross-breeding. Exp. Appl. Acarol. 18: 351-360.

Osakabe, M., T. Hirose, and M. Sato. 2002. Discrimination of four Japanese *Tetranychus* species (Acari: Tetranychidae) using PCR-RFLP of the inter-transcribed spacer region of nuclear ribosomal DNA. Appl. Entomol. Zool. 37: 399-407.

Osakabe, M., Y. Kotsubo, R. Tajima, and N. Hinomoto. 2008. Restriction fragment length polymorphism catalog for molecular identification of Japanese *Tetranychus* spider mites (Acari: Tetranychidae). J. Econ. Entomol. 101: 1167-1175.

Qiu, B., Y. Chen, L. Liu, W. Peng, X. Li, M. Z. Ahmed, V. Mathur, Y. Du, and S. Ren. 2009. Identification of three major *Bemisia tabaci* biotypes in China based on morphological and

DNA polymorphisms. Prog. Nat. Sci. 19: 713-718.

Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230: 1350-1354.

Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487-491.

Scheffer, S. J., M. L. Lewis, and R. C. Joshi. 2006. DNA barcoding applied to invasive leafminers (Diptera: Agromyzidae) in the Philippines. Ann. Entomol. Soc. Am. 99: 204-210.

Shatters, Jr. R. G., C. A. Powell, L. M. Boykin, H. Liansheng, and C. McKenzie. 2009. Improved DNA barcoding method for *Bemisia tabaci* and related Aleyrodidae: development of universal and *Bemisia tabaci* biotype-specific mitochondrial cytochrome c oxidase I polymerase chain reaction primers. J. Econ. Entomol. 102: 750-758.

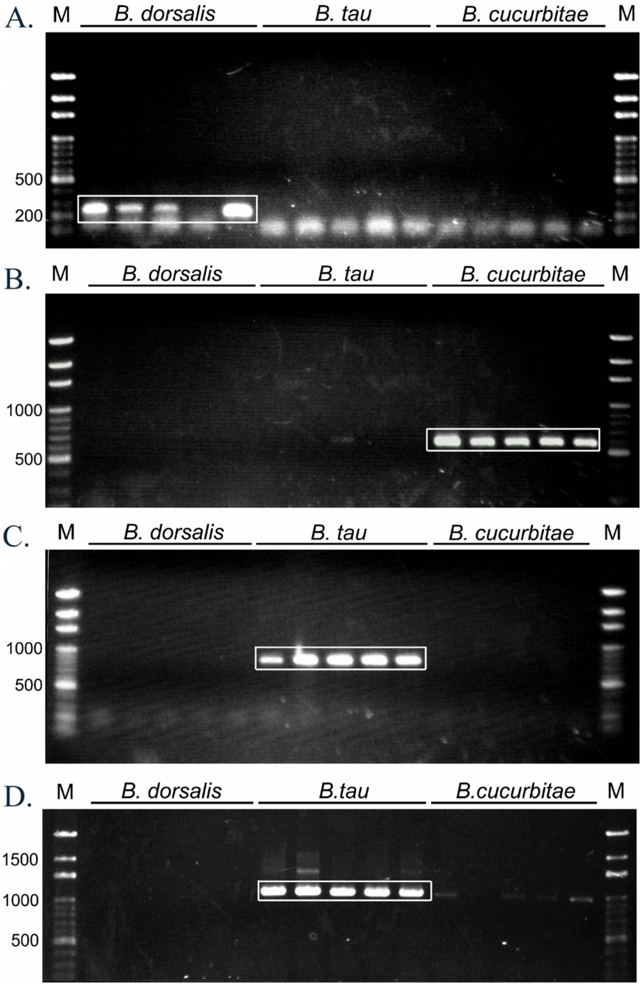
Toda, S., M. Osakabe, and S. Komazaki. 2000. Interspecific diversity of mitochondrial COI sequences in Japanese *Panonychus* species (Acari: Tetranychidae). Exp. Appl. Acarol. 24: 821-829.

Wang, C. H., C. C. Ko, C. C. Liu, and C. N. Chen. 2004. Development of rapid identification of *Bemisia argentifolii* (Hemiptera: Aleyrodidae) by PCR. Formosan Entomol. 24: 229-246 (in Chinese).

Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18: 6531-6535.

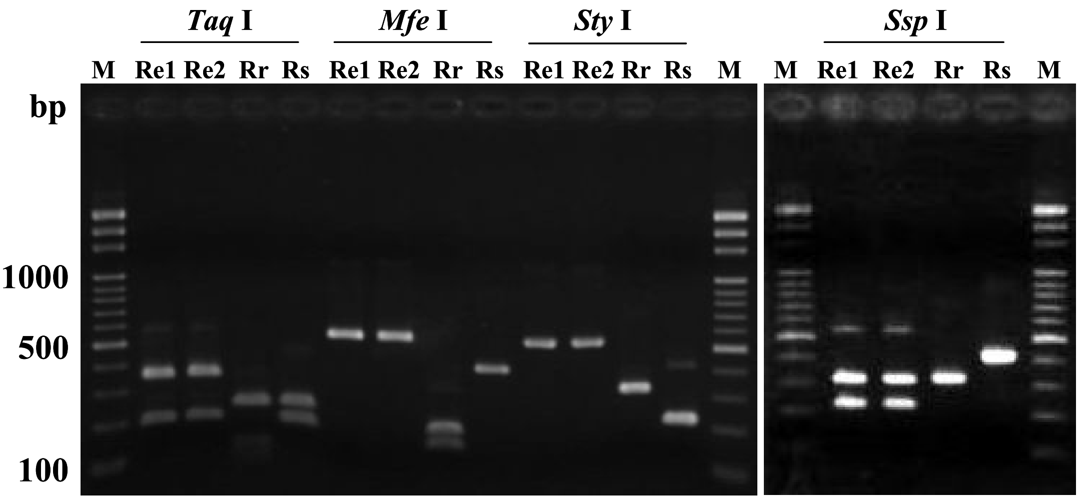
Xu, G., G. R. Wang, K. M. Wu, and Y. Y. Guo. 2002. Gene flow analysis among different geographical populations of *Helicoverpa armigera* (Hübner) by restriction fragment length polymorphisms. Cotton Sci. 14: 352-355 (in Chinese).

Yeh, H. T., C. C. Ko, and T. C. Hsu. 2006. Diagnostic techniques for the quarantine pest, *Nasonovia ribisnigri* (Mosley) (Hemiptera: Aphididae). Formosan Entomol. 26: 283-293 (in Chinese).


A.
M
B. dorsalis
B. tau
B. cucurbitae
M
500
200
B.
M
B. dorsalis
B. tau
B. cucurbitae
M
1000
500
C.
M
B. dorsalis
B. tau
B. cucurbitae
M
1000
500
D.
M
B. dorsalis
B.tau
B.cucurbitae
M
1500
1000
500

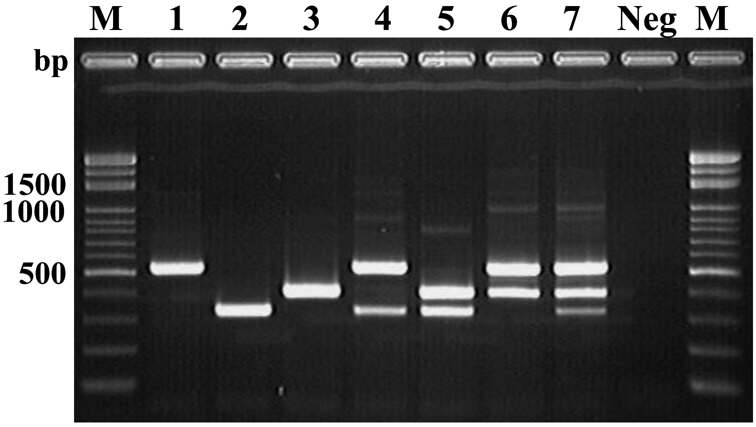
圖一、應用具蟲種專一性引子測試東方果實蠅、瓜實蠅與南瓜實蠅之序列特徵化增幅區域 (SCAR) 圖譜。(A) 以 Bd1F/Bd1R 可自東方果實蠅增幅得一 224 bp 大小之 DNA 片段 (引子黏合溫度為 66°C，增幅週期數為 40)；(B) 以 Bc1F/Bc1R 可自瓜實蠅增幅得一 589 bp 大小之 DNA 片段 (引子黏合溫度為 53°C，增幅週期數為 35)；(C) 以 Bt1F/Bt1R 可自南瓜實蠅增幅得一 827 bp 大小之 DNA 片段 (引子黏合溫度為 62°C，增幅週期數為 35)；(D) 以 Bd2F/Bd2R 可自東方果實蠅增幅得一 1005 bp 大小之 DNA 片段 (引子黏合溫度為 60°C，增幅週期數為 35)。M 為 100 bp 核酸標準標誌。(摘自 Lu *et al*. (2002))。

Fig. 1. Sequence-characterized amplified region (SCAR) profiles of *Bactrocera dorsalis*, *B. cucurbitae*, and *B. tau* generated with different species-specific oligonucleotide primers. (A) A 224-bp fragment was amplified with Bd1F/Bd1R from *B. dorsalis* (annealing temperature, 66°C; cycle number, 40); (B) a 589-bp fragment was amplified with Bc1F/Bc1R from *B. cucurbitae* (annealing temperature, 53°C; cycle number, 35); (C) a 827-bp fragment was amplified with Bt1F/Bt1R from *B. tau* (annealing temperature, 62°C; cycle number, 35); (D) a 1005-bp fragment was amplified with Bt2F/Bt2R from *B. tau* (annealing temperature, 60°C; cycle number, 35). The molecular size standard (M) is 100 bp. (From Lu *et al*. (2002)).


Taq I
Mfe I
Sty I
Ssp I
M Re1 Re2 Rr Rs Re1 Re2 Rr Rs Re1 Re2 Rr Rs M
M Re1 Re2 Rr Rs M
bp
1000
500
100

圖二、以限制酶剪切根蟎核糖體 DNA ITS1 區域之 PCR-RFLP 電泳圖譜。Re1 為來自紐西蘭鬱金香的刺足根蟎 (*Rhizoglyphus echinopus* (Fumouze＆Robin))，Re2 為來自荷蘭風信子的刺足根蟎，Rr 為羅賓根蟎 (*R. robini* Claparede)，Rs 為長毛根蟎 (*R. setosus* Manson)。M 為核酸標準標誌。(摘自 Liu *et al*. (2006))。

Fig. 2. PCR-amplified species-specific ITS1 region of rDNA from bulb mites digested with restriction enzymes. Re1, *Rhizoglyphus echinopus* from tulip of New Zealand; Re2, *R. echinopus* from hyacinth of Netherlands; Rr, *R. robini*; Rs, *R. setosus*. M, markers. (From Liu *et al*. (2006))



圖三、結合一般性引子ITS5/RNA2與下游具種專一性引子Re8/Rr7/Rs7進行巢式複合式PCR，以同時檢測刺足根蟎、羅賓根蟎及長毛根蟎之電泳圖。DNA 模板如下：行 1 為刺足根蟎，行 2 為羅賓根蟎，行 3 為長毛根蟎，行 4 為刺足根蟎加羅賓根蟎，行 5 為羅賓根蟎加長毛根蟎，行 6 為刺足根蟎加長毛根蟎，行 7 為刺足根蟎加羅賓根蟎加長毛根蟎。Neg 為無 DNA 對照組。M 為核酸標準標誌。(摘自 Liu *et al*. (2006))。

Fig. 3. DNA bands amplified from DNAs of Rhizoglyphus echinopus, R. robini and R. setosus using mixtures of universal primers ITS5/RNA2 and species-specific reverse primers Re8/ Rr7/ Rs7 by nested multiplex PCR. 1 = R. echinopus; 2 = R. robini; 3 = R. setosus; 4 = R. echinopus plus R. robini; 5 = R. robini plus R. setosus; 6 = R. echinopus plus R. setosus; 7 = R. echinopus plus R. robini plus R. setosus. Neg, negative control (no DNA added). M, markers. (From Liu et al. (2006)).

Current Status and Future Prospects of Molecular Biological Techniques Used in the Species Identification of Agricultural Pests

Shu-Chen Chang[1], Me-Chi Yao[1], Yen-Hou Chen[2], and Kuang-Hui Lu[2*]

Abstract

Traditionally, species identification of agricultural pests is mostly based on the morphological characters of adults. However, it is difficult to discriminate the species by morphological characters when pests are in their immature stages or left wreckages; nevertheless, it can be improved by using the molecular biological techniques. In this paper, we review the several major techniques used in the species identification of agricultural pests, including DNA sequence analysis, random amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR), sequence characterized amplified regions (SCARs), PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), species-specific PCR, multiplex PCR and biochip. Additionally, the advantages and disadvantages of each individual technique and its future prospects are discussed as well.

Key words: molecular technique, species identification, polymerase chain reaction, biochip

---

[1] Applied Zoology Division, Agricultural Research Institute, Council of Agriculture.

[2] Department of Entomology, National Chung Hsing University.

[*] Corresponding email: khlu@dragon.nchu.edu.tw

View publication stats